

文章编号: 1001-8689(2012)03-0202-05

组合抗性筛选法选育达托霉素高产菌株

张智翔 段然 敬科举* 吴意珣 卢英华
(厦门大学化学化工学院化学工程与生物工程系, 厦门 361005)

摘要: **目的** 利用组合抗性筛选法选育达托霉素高产菌株。**方法** 以玫瑰孢链霉菌(*Streptomyces roseosporus* ATCC 11379)为出发菌株, 通过在不同浓度梯度的达托霉素和链霉素复合抗性平板上进行抗性筛选。**结果** 筛选到一株高产达托霉素的突变株D1000-S3-2, 经摇瓶发酵验证达托霉素发酵单位可达59mg/L, 比出发菌株提高了63.8%。**结论** 实验证明组合抗性筛选是一种简单高效筛选方法。

关键词: 达托霉素; 玫瑰孢链霉菌; 组合抗性筛选

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A

Screening of high daptomycin-producing strains by combined antibiotics resistance screening method

Zhang Zhi-xiang, Duan Ran, Jing Ke-ju, Wu Yi-xun and Lu Ying-hua
(Department of Chemical and Biochemical Engineering, College of Chemistry and Chemical Engineering,
Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract Objective Combined antibiotics resistance screening method was applied to screen daptomycin high-producing strain. **Methods** Based on the biosynthetic pathway and metabolization mechanism of daptomycin, combined antibiotics resistance screening method was applied to screen daptomycin high-producing strain from original strain of *Streptomyces roseosporus* ATCC 11379. **Results** A mutant strain D1000-S3-2 was obtained. The yield of daptomycin was 59 mg/L in flask by the mutant strain, which increased 63.8%, compared to that of the parental strain. **Conclusion** It was demonstrated that the method provides a fast and effective way of screening *S. roseosporus*.

Key words Daptomycin; *Streptomyces roseosporus*; Combined antibiotics resistance screening

达托霉素是由玫瑰孢链霉菌(*Streptomyces roseosporus*)经发酵得到的一种新型抗生素, 它的结构是由一个十碳烷侧链与一个13个氨基酸组成的环状 β 氨基酸肽链N-末端的色氨酸连接而成^[1]。其作用模式不同于其它抗生素, 它通过扰乱细胞膜对氨基酸的转运, 从而阻碍细菌细胞壁肽聚糖的生物合成, 改变细胞质膜的性质; 它还能通过破坏细菌的细胞膜, 使

其内容物外泄而达到杀菌的目的^[2-3], 因此细菌对达托霉素产生耐药性可能会比较困难。达托霉素具有在体外抗绝大多数的临床革兰阳性菌的作用。主要用于耐药菌, 如耐万古霉素肠球菌(VRE), 耐甲氧西林金葡菌(MRSA), 对糖肽类敏感金葡菌(GISA), 凝固酶阴性葡萄球菌(CNS)和耐青霉素肺炎链球菌(PRSP)的感染^[4-5]。

收稿日期: 2011-04-21

基金项目: 国家自然科学基金(No. 31071488)

作者简介: 张智翔, 男, 生于1985年, 在读硕士研究生, 主要从事微生物发酵, E-mail: net7@xmu.edu.cn

*通讯作者, E-mail: jkj@xmu.edu.cn

1997年, Cubist公司从礼来公司取得达托霉素的专利权, 并分别在菌血症和复杂的皮肤和软组织感染中进行了I期和II期临床试验^[6]。2003年底, 美国食品与药物管理局(FDA)经过快速审理程序批准注射用达托霉素(daptomycin)(商品名cubicin)用于治疗由一些革兰阳性敏感菌株引起的并发性皮肤及皮肤结构感染, 如脓肿、手术切口感染和皮肤溃疡。在各种动物模型中, 达托霉素对药物敏感与耐药性革兰阳性菌均有效力。正在进行的第三阶段研究在每天给药1次的基础上研究达托霉素对革兰阳性菌引起的严重感染的药效, 包括皮肤和软组织感染, 群落获得性肺炎和VRE感染。其副作用小, 安全性高^[7]。

1989年, Huber^[8]等人在专利中公布了10种发酵玫瑰孢链霉菌产达托霉素的母核化合物A21978C的方法, 其中最高的上罐产量达到1940mg/L, 这篇专利也是Cubist公司生产达托霉素的理论依据。卢文玉^[9]等人利用20mW激光辐照玫瑰孢链霉菌(D-38)20min, 筛选出突变菌株, 摇瓶发酵达托霉素产量达到81.2mg/L, 比出发菌株提高了39%。周剑等^[10]通过离子注入技术对达托霉素产生菌玫瑰孢链霉菌进行诱变选育, 使用N⁺作为离子源, 初步探讨N⁺注入对达托霉素生产菌所产生的生物学效应。通过链霉素抗性筛选法获得多株遗传稳定性较好的高产突变株, 其中突变株N3-36发酵单位比出发菌株提高了26%。

链霉菌产抗生素能力与链霉素抗性基因之间的对应关系是目前抗生素科研领域的一个研究热点。Ochi^[11-13]报道他们在多种链霉菌中获得*rel*突变株, *rel*突变株的共同特点是其产抗生素能力消失, 并且菌体内积累鸟苷四磷酸(ppGpp)的能力明显下降。而在同种链霉菌的正常菌株中菌体形态分化和产抗生素的开始往往伴随ppGpp的激增。这充分表明ppGpp是次级代谢起始的优势信号因子, 对抗生素生产的启动具有重要作用。而抗生素作为代谢终产物对其产生菌可能有几个方面的作用: (1)作为终产物对参与抗生素生物合成的有关酶进行反馈调节; (2)对产生菌本身有抑制、杀死作用。因此筛选产生菌对自身代谢产物的耐受性的提高, 将有利于抗生素产量的提高。引入混合抗药性突变对提高抗生素的合成非常有效。在Ochi的研究中向*S. coelicolor* A3(2)中引入庆大霉素、链霉素和利福平的抗性突变能更强地引起放线紫红素合成量的提高。向链霉素突变体中引入庆大霉素或利福平抗性突变的双突变进一步提高了放线紫红素的合成量(1.7~2.5倍)。

目前在高产抗生素菌株筛选过程中, 化学和物

理诱变依然是广泛采用的方法。然而传统诱变筛选菌株变异的随机性比较大, 而且出现负突变的几率大, 筛选的样本量巨大, 直接造成筛选的效率不高。本实验依据抗生素产生菌抗性基因和抗生素的合成基因以及调控基因紧密连锁而容易发生共突变的理论^[14]。本文在进行达托霉素高产菌株筛选工作时, 首次采用以菌株的自身的代谢产物达托霉素作为主要的抗性筛选抗生素, 在此基础上组合链霉素的抗性筛选, 促进了菌株正向突变的几率, 大大提高筛选的效率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

玫瑰孢链霉菌(*Streptomyces roseosporus*) ATCC 11379和金黄色葡萄球菌由本实验室保存。

1.1.2 培养基

玫瑰孢链霉菌斜面培养基DA1(g/L): 葡萄糖4, 麦芽提取物10, 酵母提取物4, CaCO₃ 2, 琼脂15, pH7.0。

玫瑰孢链霉菌一、二级种子液体培养基(g/L): 糊精5, 胰蛋白胨大豆肉汤30, pH7.0。玫瑰孢链霉菌发酵培养基(g/L): 酵母粉11, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O 1.5, 葡萄糖10.7, 玉米糊精30, 糖蜜3.0, pH7.0。

金黄色葡萄球菌平板培养基LB(g/L): 酵母粉5, 蛋白胨10, NaCl 10, 琼脂8, pH6.8。

1.2 方法

1.2.1 玫瑰孢链霉菌培养方法

分离平板培养条件: 培养温度30℃, 培养时间依菌落生长情况而定; 一级、二级种子摇瓶培养条件: 培养温度30℃, 装液量50mL/250mL, 摇床转速200r/min, 培养时间48~56 h, 具体时间视菌体生长情况而定; 发酵摇瓶培养条件: 培养温度30℃, 装液量50mL/250mL, 接种量5%, 转速200r/min, 培养时间8~10d, 至镜检菌丝完全断裂; 生物活性测定平板培养条件: 培养温度37℃, 培养时间16~24 h。

1.2.2 孢子悬液的制备

准备装有一定量无菌水和数颗玻璃珠的50mL离心管, 灭菌备用。将DA1斜面培养基上长好的玫瑰孢链霉菌原始菌孢子用接种环刮入离心管。将离心管置于振荡器上震荡, 使孢子充分打散并均匀分散。孢子悬液可立即使用, 或加入20%甘油保存于-20℃备用。

1.2.3 抗生素最低抑制浓度(MIC)的确定

将孢子悬液稀释10~100倍后均匀的涂布在含

有不同浓度梯度的达托霉素和链霉素平板上, 培养7~9d, 培养温度30℃。观察各平板的菌落生长情况, 以与对照相比菌落有明显减少的浓度为该抗生素对菌株的最小抑制浓度。分别确定达托霉素和链霉素的最低抑制浓度。

1.2.4 抗性菌株的生物活性测定

琼脂扩散法: 配置一定量LB培养基, 灭菌后冷却至50~60℃时, 加入0.1mL指示菌(金黄色葡萄球菌), 混匀后倒入培养皿。凝固后, 用牙签将待测琼脂块倒置于培养基上, 置于4℃冰箱1h后于37℃培养箱培养, 1~2d后观察抑菌圈大小, 将抗性菌株与原始菌和空白对照进行比较。

1.2.5 达托霉素效价测定

发酵结束, 取1mL发酵液加入离心管, 10000r/min离心5min, 取上清, 反复离心2~3次, 将上清液用0.22μm一次性针头过滤器过滤, 滤液用于HPLC法测定, 进样量为50μL。

2 结果与分析

2.1 原始菌株对达托霉素及链霉素的最低抑制浓度

2.2.1 原始菌株对达托霉素的最低抑制浓度(MIC)

以空白对照也就是达托霉素浓度为0的平板的菌落数和菌体形态作为菌体生长情况好的标准, 其他达托霉素浓度的平板与之进行对比, 根据菌落数和菌落的饱满度作为菌体生长情况的衡量参数。由表1可知, 随着达托霉素浓度的增加, 玫瑰孢链霉菌在筛选平板上的单菌落逐渐减少, 当达托霉素浓度达到400mg/L时, 平板上菌落形态很差, 而浓度达到500mg/L时单菌落的数量已经很稀少, 故可以确定玫瑰孢链霉菌对达托霉素的最低抑制浓度(MIC)为400mg/L。

2.2.2 原始菌株对链霉素的最低抑制浓度(MIC)

以空白对照也就是链霉素浓度为0的平板的菌落数和菌体形态作为菌体生长情况好的标准, 其他链霉素浓度的平板与之进行对比, 根据菌落数和菌

落的饱满度作为菌体生长情况的衡量参数。由表2可知, 随着链霉素浓度的增加, 玫瑰孢链霉菌在筛选平板上的单菌落逐渐减少, 当链霉素浓度达到1.0mg/L时, 平板上菌落形态很差, 而浓度达到1.2mg/L时单菌落的数量已经很稀少, 故可以确定玫瑰孢链霉菌对链霉素的最低抑制浓度(MIC)为1.0mg/L。

2.2 抗性菌株的筛选

2.2.1 多倍达托霉素MIC浓度和多倍链霉素MIC浓度的抗性筛选

制备的达托霉素抗性平板浓度为800、1000、1200、1400和1600mg/L, 其中1400及1600mg/L的抗性平板上未获得突变株, 而在800、1000、1200mg/L抗性平板上共获得38株达托霉素抗性菌株。

制备的链霉素抗性平板浓度为2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5和5.0mg/L, 其中5.0mg/L的抗性平板上未获得突变株, 而在2.0、2.5、3.0、3.5、4.0和4.5mg/L抗性平板上共获得74株链霉素抗性菌株。

2.2.2 达托霉素-链霉素复合抗性筛选

制备不同浓度的达托霉素-链霉素复合抗性平板如表3, 在抗性平板上共获得约31株达托霉素-链霉素复合抗性菌株。

通过达托霉素-链霉素复合抗性菌株与原始菌株的菌落形态比较可得抗性菌株与原始菌株菌落形态存在明显差异, 如图1。

观察达托霉素-链霉素抗性菌株与原始菌株的菌落形态, 发现抗性菌株菌落形态存在明显差异, 对比结果见表4。

2.3 筛选菌株的效价验证

2.3.1 利用琼脂块法进行抗性菌株的初步效价验证

根据1.2.4的方法, 初步筛选出抑菌圈直径大于原始菌株的抗性菌株共15株, 试验结果如表5所示。

2.3.2 抗性菌株的摇瓶发酵培养及效价验证

初筛获得的上述15个抗性菌株接入摇瓶种子培

表1 不同浓度的达托霉素对玫瑰孢链霉菌生长的影响

Tab. 1 Effect of daptomycin on the cultivation of *Streptomyces roseosporus*

达托霉素浓度/(mg/L)	0	100	200	300	400	500	600	700
生长情况	+++	+++	+++	++	+	-	-	-

注: +++表示长得好; ++表示长得一般; +表示长得差; -表示单菌落数量稀少

表2 不同浓度的链霉素对玫瑰孢链霉菌生长的影响

Tab. 2 Effect of streptomycin on the cultivation of *Streptomyces roseosporus*

链霉素浓度/(mg/L)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4
生长情况	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-

注: +++表示长得好; ++表示长得一般; +表示长得差; -表示单菌落数量稀少

表3 不同浓度的达托霉素与链霉素复合抗性平板的菌株筛选结果

Tab. 3 Result of *Streptomyces roseosporus* screening on daptomycin-streptomycin combined resistant plates

达托霉素浓度/(mg/L)	800	800	800	1000	1000	1000	1200	1200
链霉素浓度/(mg/L)	2.0	3.0	4.0	2.0	3.0	4.0	2.0	3.0
选取菌株数	12	5	1	7	5	1	0	0

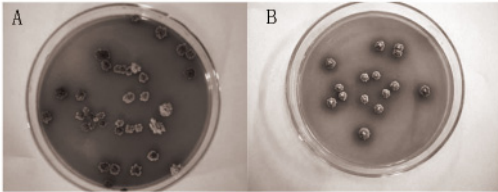


图1 达托霉素-链霉素复合抗性菌株(A)与原始菌株(B)对照
Fig. 1 Morphological character comparison between mutant strain(A) and the original strain(B)

表4 抗性菌株与原始菌株菌落形态差异比较

Tab. 4 Morphological character comparison between mutant strain and the original strain

菌株	抗性菌株	原始菌株
菌落形态	圆形"凸"起, 呈馒头状	凸起, 呈山峰状
菌落大小	较大	较小
菌落结构	松散	紧密
孢子颜色	深玫瑰色	玫瑰色
孢子丰满程度	丰满	一般
边缘有无皱纹状突起	更明显的皱纹	有
菌落表面是否光滑	粗糙	粗糙

养后, 转接入摇瓶发酵培养基, 进行摇瓶发酵培养(培养方法如1.2.1)。发酵结果用HPLC法测定达托霉素产量(见1.2.5)。图2为发酵样品与标准品样的HPLC图比较。

如表6所示, 筛选获得的15株抗性菌株经过摇瓶发酵, HPLC法测定达托霉素效价, 其中有11株抗性菌株的达托霉素产量对比原始菌株有不同程度提高。其中抗性菌株D1000-S3-2的摇瓶发酵生物量达到30g/L, 达托霉素产量达到59mg/L, 达到最高, 相对原始菌株产量提高63.8%。

2.4 抗性菌株的稳定性实验

选择上述较好的菌株4株, 在没有抗性的平板上用连续传代的方法考察其斜面的稳定性, 进行反复传代5次, 进行摇瓶发酵验证, 取3次实验的平均值, 结果如表7。

将高产菌株D1000-S3-2在固体斜面培养基上连续传代5次, 其生长周期基本一致。将各代菌种接入种子摇瓶培养基培养并最终接入摇瓶发酵培养基, 其快速生长期的时间和最高生物量均基本一致, 达

表5 抗性菌株琼脂块法初筛结果

Tab. 5 Resistant-selection results

菌株	抑菌圈直径/mm
原始	18
D1000-7	20
D1200-4	21
D1200-5	21
S2.5-6	20
S3-1	20
S4-1	19
S4-5	20
D800-S2-3	19
D800-S2-5	20
D800-S2-10	23
D800-S3-4	21
D800-S4-1	23
D1000-S2-5	21
D1000-S3-2	23
D1000-S3-5	21

注: 菌株命名中D表示达托霉素, 其后数字表示达托霉素浓度, S表示链霉素, 其后数字表示链霉素浓度。

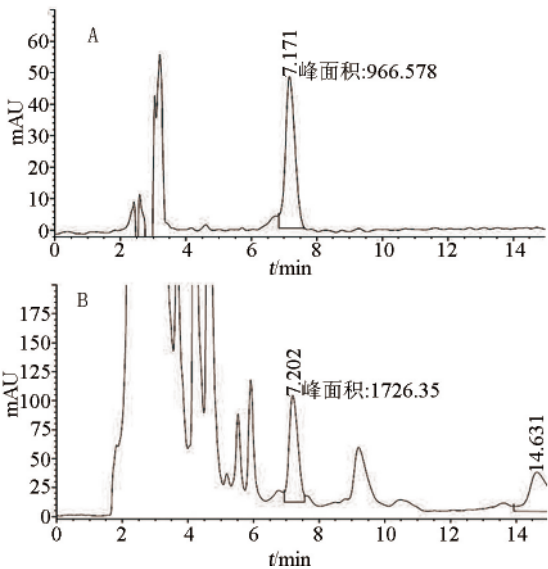


图2 达托霉素标准品(A)与发酵液样品(B)HPLC比较图
Fig. 2 HPLC results of standard daptomycin(A) and sample(B)

托霉素合成量稳定在57.5~59.0mg/L之间, 平均值为58.6mg/L, 从表7中可以看出, 筛选出的抗性菌株均

表6 抗性菌株达托霉素效价及菌体干重

Tab. 6 Daptomycin production and biomass of resistant mutants and the original strain

菌株	HPLC检测峰面/(mAU·s)	效价/(mg/L)	菌体干重/(g/L)	每克菌体干重达托霉素含量/(mg/g DCW)
原始菌株	275.6	36.1	26	1.4
D1000-7	268.6	35.2	25	1.4
D1200-4	231.8	30.5	30	1.0
D1200-5	363.1	47.3	25	1.9
S2.5-6	276.4	36.2	27	1.3
S3-1	309.2	40.4	28	1.4
S4-1	297.5	38.9	29	1.3
S4-5	427.9	55.6	25	2.2
D800-S2-3	386.5	50.3	30	1.7
D800-S2-5	323.2	42.2	26	1.6
D800-S2-10	239.6	31.5	27	1.2
D800-S3-4	194.3	25.7	28	0.9
D800-S4-1	324.1	42.3	28	1.5
D1000-S2-5	295.2	38.6	25	1.5
D1000-S3-2	454.5	59.0	30	2.0
D1000-S3-5	307.6	40.2	28	1.4

具有较好的遗传稳定性。

3 讨论

由于全球范围内抗生素及抗菌药物的滥用,细菌耐药性增强的现象已经变得十分严重,尤其在我国的及其他发展中国家。为了给那些深受耐药性细菌感染的患者提供治疗的药物和方案,新型的抗耐药菌的药物研究成为现代医药研究的当务之急。由于达托霉素不同于其他抗生素的抗菌机理,使其主要用于治疗耐药菌感染的疾病。我国尽管已经开始达托霉素的生产研究,但是目前产量较低,且生产工艺复杂。

本研究以玫瑰孢链霉菌为出发菌株,以葡萄糖、麦芽提取物、酵母提取物、CaCO₃、琼脂粉作为主要原料的培养基,用于培养玫瑰孢链霉菌孢子,通过达托霉素和链霉素联合抗性筛选法,筛选可高产达托霉素的玫瑰孢链霉菌。筛选获得的玫瑰孢链霉菌D1000-S3-2的摇瓶发酵生物量达到30g/L,达托霉素产量达到59mg/L,与原始玫瑰孢链霉菌株相比,其产量提高63.8%。

该筛选工艺简便、高效,可用于菌株的大量筛选,且对于玫瑰孢链霉菌的达托霉素生产能力有显著的提高。今后将利用筛选得到的抗性菌株,进行发酵以及提纯工艺的研究,完善整个达托霉素生产工艺,以促进其在国内的生产的商业化。

参考文献

- [1] Micklefield J. Daptomycin structure and mechanism of

表7 稳定性实验

Tab. 7 Genetical stability experiment

代数	达托霉素产量/(mg/L)			
	D1000-S3-2	S4-5	D800-S2-3	D1200-5
1	59.0	55.6	50.3	47.3
2	59.2	55.5	50.7	47.1
3	58.7	54.5	48.0	47.3
4	58.8	54.0	47.2	46.2
5	57.5	54.0	47.2	46.0

action revealed[J]. *Chem Biol*, 2004, 11: 949-957.

- [2] Raja A, LaBonte J, Lebbos J, *et al*. Fresh from the pipeline: Daptomycin[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2: 943-944.
- [3] Cunha B A., Hamid N, Kessler H, *et al*. Daptomycin cure after cefazolin treatment failure of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) tricuspid valve acute bacterial endocarditis from a peripherally inserted central catheter (PICC) line[J]. *Heart Lung*, 2005, 34(6): 442-447.
- [4] Tally F P, Zeckel M, Wasilewski M M, *et al*. Daptomycin: a novel agent for Gram-positive infections[J]. *Exp Opin Invest Drugs*, 1999, 8: 1223-1238.
- [5] Jeu L A, Fung H B. Daptomycin: a cyclic lipopeptide antimicrobial agent[J]. *Clin Ther*, 2004, 26(11): 1728-1757.
- [6] Nichols R L. Optimal treatment of complicated skin and skin structure infections[J]. *Antimicrob Chemother*, 1999,

(下转第219页)

根据实验所得的最佳分离纯化工艺条件, 进行连续三批的工艺验证实验, 结果见表3。由表3可知, 该工艺过程总收率均大于60%, 产品纯度大于95%。

4 结论

本实验采用大孔吸附树脂HZ830分离提取Echinocandin B, 并进一步采用丙酮结晶的方法纯化, 得到高纯度Echinocandin B, 提取总收率大于



图6 Echinocandin B的晶体照片
Fig. 6 The photo of Echinocandin B crystal

表3 工艺验证实验
Tab. 3 The experiment of process validation

Echinocandin B浸提液		Echinocandin B粗提物		Echinocandin B结晶		总收率/%
浓度/(μg/ mL)	体积/L	重量/g	HPLC含量/%	重量/g	HPLC含量/%	
790	5	3.31	86.5	2.55	96.2	62.1
810	10	6.84	87.3	5.21	95.8	61.6
730	20	12.17	85.9	9.19	96.7	60.9

60%, 产品纯度大于95%。该方法简单易行, 收率稳定, 安全性高, 适合工业化生产, 为阿尼芬净的合成提供了有力的原料基础。

参 考 文 献

[1] 黄金竹. 抗真菌药物的研究进展[J]. 国外医药: 抗生素分册, 2007, 28(6): 246-251.

[2] 曹国颖, 傅得兴. 新型棘白菌素类抗真菌药阿尼芬净[J]. 中国新药杂志, 2005, 14(11): 1358-1361.

[3] 上田聪, 田中美穗, 江崎正美等. 环脂肽物的脱酰化方法: CN 97194475.X [P]. 1997-03-06.

[4] PROTIA, LLC, Reno, NV(US). Deuterium-enriched Anidulafungin: US 2009/0062185 A1[P]. 2009-03-05.

[5] Eli Lilly and Company, Indianapolis, Ind. Method of producing the A-30912 antibiotics. US 4288549[P]. 1981-09-08.

[6] 上海医药工业研究院. 制备棘球康定B的方法: CN 200910133117.6[P]. 2009-04-01.

(上接第206页)

44(Suppl A): 19-23.

[7] Safdar N, Andes D, Craig W A. *In vivo* pharmacodynamic activity of daptomycin[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48: 63-68.

[8] Floyd M Huber, Richard L Pieper, Anthony J Tietz. Process for producing A-21978C derivatives: US, 4,885,243[P]. 1989-12-5.

[9] 卢文玉, 闻建平, 范晶华, 等. 激光诱变玫瑰孢链霉菌结合链霉素抗性筛选法选育达托霉素高产菌株[J]. 微生物学通报, 2006, 33(3): 114-117.

[10] 周剑, 刘颖, 方东升, 等. 氮离子注入玫瑰孢链霉菌选育达托霉素高产菌株的研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2008, 26(5): 317-320.

[11] Ocm K, Okamoto S, Tozawa Y, *et al*. Ribosome engineering and secondary metabolite production[M]. *Advances in Applied Microbiology*, Academic Press, 2003:155-184.

[12] Hu H F, Ochi K. Novel approach for improving the productivity of antibiotic-producing strains by inducing combined resistant mutations[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(4): 1885-1892.

[13] Hesketh A, Ochi K. A novel method for improving *Streptomyces coelicolor* A3(2) for production of actinorhodin by introduction of rpsL mutation conferring resistance to streptomycin[J]. *J Antibiot*, 1997, 50(6): 532-541.

[14] Chater K F, Bruton C J. Resistance, regulatory and production genes for the antibiotic methylenomycin are clustered[J]. *EMBO J*, 1985, 4: 1893-1897.